



PATENT
0452-0110P

05.9 #19
02
12/3/01

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Hyun Chul LEE et al. Conf.:
Appl. No.: 09/706,690 Group: Unassigned
Filed: November 7, 2000 Examiner: UNASSIGNED
For: TREATMENT OF DIABETES USING SINGLE
CHAIN INSULIN ANALOG

L E T T E R

Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

August 6, 2001

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
KOREA	2000-58003	October 2, 2000


A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By


Joseph A. Kolasch, #22,463

JAK/cpw
0452-0110P

P.O. Box 747
Falls Church, VA 22040-0747
(703) 205-8000

Attachment



7706,090 #9
L 3 3000
CIP, JIP
7/16 2001 5000

대한민국 특허청

KOREAN INDUSTRIAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원 번호 : 특허출원 2000년 제 58003 호
Application Number

출원 년 월 일 : 2000년 10월 02일
Date of Application

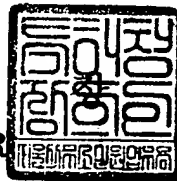
출원 인 : 이현철
Applicant(s)



2000 년 12 월 15 일

특 허 청

COMMISSIONER



CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2000.10.02
【발명의 명칭】	단일사슬 인슐린 유도체의 유전자를 포함하는 당뇨병 치료용 벡터
【발명의 영문명칭】	Vector for Curing Diabetes Mellitus Containing Gene of Single-chain Insulin Analog
【출원인】	
【성명】	이현철
【출원인코드】	4-2000-028108-7
【대리인】	
【성명】	이한영
【대리인코드】	9-1998-000375-1
【포괄위임등록번호】	2000-032929-1
【발명자】	
【성명】	이현철
【출원인코드】	4-2000-028108-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	신항철
【성명의 영문표기】	SHIN, Hang Cheol
【주민등록번호】	610125-1041114
【우편번호】	137-150
【주소】	서울특별시 서초구 원지동 401-37
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김수진
【성명의 영문표기】	KIM, Su Jin
【주민등록번호】	710830-2068325
【우편번호】	412-220
【주소】	경기도 고양시 덕양구 행신동 938 햇빛마을 1819동 1304호
【국적】	KR

【발명자】**【성명의 국문표기】** 김경섭**【성명의 영문표기】** KIM, Kyung Sup**【주민등록번호】** 590527-1051111**【우편번호】** 150-010**【주소】** 서울특별시 영등포구 여의도동 삼익 B동 202호**【국적】** KR**【심사청구】** 청구**【미생물기탁】****【기탁기관명】** 한국종균협회 부설 한국미생물보존센터**【수탁번호】** KCCM-10188**【수탁일자】** 2000.05.17**【핵산염기 및 아미노산 서열목록】****【서열개수】** 022**【서열목록의 전자문서】** 첨부**【취지】** 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
이한영 (인)**【수수료】****【기본출원료】** 20 면 29,000 원**【가산출원료】** 25 면 25,000 원**【우선권주장료】** 0 건 0 원**【심사청구료】** 14 항 557,000 원**【합계】** 611,000 원**【감면사유】** 개인 (70%감면)**【감면후 수수료】** 183,300 원**【첨부서류】** 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_3통[사, 역문]

【요약서】**【요약】**

본 발명은 인슐린 또는 인슐린 유도체의 B 사슬; 인슐린 또는 인슐린 유도체의 A 사슬; 및, 전기 B 사슬과 A 사슬의 사이에 위치하고, 5 내지 18개의 아미노산 서열을 가지는 펩티드를 포함하는 단일사슬 인슐린 유도체(single-chain insulin analog, SIA), 전기 유도체를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료제, 전기 유도체를 코딩하는 유전자, 전기 유전자를 포함하는 유전자 치료용 벡터 및 전기 벡터를 이용한 당뇨병의 유전자 치료방법에 관한 것이다. 본 발명의 당뇨병의 유전자 치료방법은 SIA의 염기서열, SV40 poly(A) 신호서열, SV40 인핸서(enhancer) 및 L형 피루브산 인산화효소(LPK)의 프로모터를 바이러스 벡터에 삽입하여 재조합 바이러스 벡터를 작성하고, 이를 세포주에 전이시키는 단계; 전기 세포주에 바이러스를 감염시키고, 바이러스가 감염된 세포주를 배양한 다음, 이로부터 바이러스를 수득하는 단계; 및, 수득한 바이러스를 불활성화시키고, 이를 당뇨병 증상을 나타내는 인간이 아닌 포유동물에 주입시키는 단계를 포함한다. 본 발명의 유전자 치료용 벡터는 당뇨병의 치료에 필요한 SIA의 발현이 체내의 포도당 농도에 따라 조절되므로, 당뇨병을 치료하는데 이용될 수 있을 것이다.

【대표도】

도 1

【색인어】

단일사슬 인슐린 유도체(SIA), LPK 프로모터, rAAV, 당뇨병

【명세서】**【발명의 명칭】**

단일사슬 인슐린 유도체의 유전자를 포함하는 당뇨병 치료용 벡터{Vector for Curing Diabetes Mellitus Containing Gene of Single-chain Insulin Analog}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 발현벡터 pLPK-SIA-1의 유전자 지도를 나타내는 그림이다.

도 2는 동물세포에서 LPK 프로모터가 SIA-1의 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 3은 SIA-1과 LPK-SIA-1의 DNA를 간에서 검출한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.

도 4는 SIA-1과 LPK-SIA-1의 mRNA를 간에서 간접적으로 검출한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다.

도 5는 재조합 바이러스의 농도와 시간에 따른 혈당량의 변화량을 나타낸 그래프이다.

도 6은 시간의 경과에 따른 LPK-SIA-1의 단일사슬 유전자의 변화를 나타내는 사진이다.

도 7a는 재조합 바이러스를 처리하고, 1개월이 경과한 간의 조직에서 SIA-1의 면역조직화학적 염색결과를 나타내는 사진이다.

도 7b는 정상간의 조직에서 SIA-1의 면역조직화학적 염색결과를 나타내는 사진이다.

도 8a는 재조합 바이러스를 처리하고, 1개월이 경과한 간의 조직사진이다.

도 8b는 정상간의 조직사진이다.

도 9a는 포도당 내구성 실험의 결과, 대조군과 실험군의 혈당량의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 9b는 포도당 내구성 실험의 결과, 대조군의 혈중 인슐린양과 실험군의 혈중 SIA-1 양의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 9c는 포도당 내구성 실험의 결과, 대조군과 실험군의 혈중 글루카곤의 농도의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 10a는 대조군과 실험군의 혈당량을 시간의 경과에 따라 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 10b는 포도당 내구성 실험의 결과, 대조군과 실험군의 혈당량의 변화를 나타내는 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<16> 본 발명은 단일사슬 인슐린 유도체의 유전자를 포함하는 당뇨병을 치료하기 위한 벡터에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 단일사슬 인슐린 유도체

(single-chain insulin analog, SIA), 전기 유도체를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료제, 전기 유도체를 코딩하는 유전자, 전기 유전자를 포함하는 유전자 치료용 벡터 및 전기 벡터를 이용한 당뇨병의 유전자 치료방법에 관한 것이다.

<17> 본 발명의 단일사슬 인슐린 유도체(SIA)는 인슐린 또는 인슐린 유도체의 B 사슬; 인슐린 또는 인슐린 유도체의 A 사슬; 및, 전기 B 사슬과 A 사슬의 사이에 위치하고, 5 내지 18개의 아미노산 서열을 가지며, 하기 일반식(I)의 구성을 갖는 펩티드를 포함한다.

<18>
$$U_m - Y - U_n \quad (I)$$

<19> 상기 식에서,

<20> U는 arg 또는 lys이고;

<21> Y는 최소한 1개의 gly을 포함하는 3 내지 16개의 아미노산 서열을

<22> 가지는 펩티드이며;

<23> m은 0 또는 2이고; 및,

<24> n은 $2-m$ 이다.

<25> 당뇨병(insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)은 자가면역반응에 의하여 인슐린을 생산하는 췌장의 베타세포가 파괴되어 발병하는데, 이의 치료방법으로 인슐린의 주입, 췌장의 베타세포의 재생 및 이식, 유전자 치료 등 여러가지 방법이 연구되었다(참

조: Giannoukakis, N. et al., Diabetes, 48:2107-2121, 1999).

<26> 현재, 당뇨병환자들의 치료책으로 가장 널리 이용되고 있는 방법으로, 1일에 2-3회 가량의 인슐린 투여가 이루어지고 있다. 그러나, 이러한 방식으로는 여러가지 생리적 자극에 따라 변화되어지는 인슐린의 요구량을 정확하게 충족시키기가 어렵기 때문에, 약간의 고혈당이나 저혈당상태에 방치되어지기가 쉬운데 특히 장기간의 고혈당 상태에서는 여러 종류의 조직손상을 일으켜, 당뇨병성 신증, 신경증, 망막증, 심혈관 관련질환과 같은 당뇨병성 합병증을 유발시킨다고 알려져 있다(참조: The Diabetes Control, Complications Trila Research Group, N. Engl. J. Med., 329:977-986, 1993). 따라서, 이렇게 외부의존적으로 이루어지는 인슐린의 투여는 번거로울 뿐만 아니라, 당뇨병에 있어서 장기적인 합병증의 발병을 초래하기 때문에, 당뇨병에 있어서 완벽한 치료방법이라고 이야기하기 어려운 실정이다. 제 2형 당뇨병의 경우, 약 30%의 당뇨병 환자들에 있어 인슐린투여를 요하고 있다.

<27> 다른 방편으로서, 췌장의 베타세포를 재생시키기 위하여 다각도로 연구되고 있으며 (참조: Levine, F., Diabetes Metab. Rev., 13:209-246, 1997), 일부 그룹에서는 췌장의 베타세포의 재생이 이루어지도록 유전자치료를 시도하고 있지만(참조: Levine, F. & Leibowitz, G., Mol. Med., 5:165-171, 1999), 아직까지는 췌장의 베타세포의 재생기전이 확실히 규명되지 않은 상태이기 때문에, 유전자치료의 대상유전자의 선정에 문제가 있다. 더구나, 췌장의 베타세포의 재생에 성공한다고 할지라도 당뇨병의 발병원인으로 알려진 자가면역기전에 의해 재생된 베타세포가 다시 파괴될 위험성이 있기 때문에, 베타세포를 대상으로 하는 유전자치료는 아직까지는

답보적인 상태이다. 그리하여, 췌장의 이식방법을 사용하기도 하지만, 아직까지는 공여자의 제한이 따르고, 실패확률이 높으며, 수술에 성공하였다고 할지라도 평생 면역억제제의 투여를 받아야 하는 등 여러가지 문제점이 아직 해결되지 않고 있다. 간혹, 배양된 베타세포의 이식이 언급되고 있지만, 아직까지는 베타세포를 효율적으로 분리하는 방법이 개발되어 있지 않은 상태이고, 힘들게 베타세포를 분리하였다고 하더라도 생체의 조건에서 배양하여 분리된 베타세포들이 인슐린 분비능을 소실하기가 쉽기 때문에, 임상적으로 적용하기에는 많은 문제점이 있다.

<28> 한편, 당뇨병을 대상으로 하는 유전자치료법은 1980년대 중반부터 그 가능성이 제기되어 왔고, 현재에 이르러서는 여러 종류의 대상세포를 이용한 다양한 시도들이 이루어지고 있는 상태이다(참조: Efrat, S., Diabetologia, 41:1401-1409, 1998). 이러한 유전자치료법은 췌장의 베타세포가 아닌 다른 세포에서 인슐린의 분비기능을 회복시키기 위한 유전자조작법으로 주로 시도되어지고 있는데, 그 이유는 당뇨병환자의 경우 췌장의 베타세포의 90% 이상이 이미 파괴된 상태이므로, 이러한 세포에서 인슐린 분비기능을 회복시키는 것은 그 치료효율이 많이 떨어질 것으로 생각되어지기 때문이다. 비췌장세포를 대상으로 하는 인슐린 유전자치료법은 개체내에서 자가복제하여 오래도록 존재하고 분화, 증식하여 이입유전자의 발현이 안정적으로 증폭될 수 있는 세포를 대상으로 하여 시도되고 있다.

<29> 무어(Moore) 등은 뇌하수체 전엽세포주에 프로인슐린 cDNA를 이입하여, 신경세포에서 인슐린분비기능이 회복되도록 시도하였고, 뇌하수체 중엽세포주에 프로인슐린 cDNA를 이입하여 유전자치료를 시도하였으나(참조: Moore, H.P. et al.,

Cell, 35:531-538, 1993), 이러한 신경세포들에서는 췌장의 베타세포에서와 유사한 포도당감지체계가 없고, 부신피질자극호르몬의 분비가 포도당에 의해 증가되어 커싱증후군(Cushing syndrome) 등의 부작용이 나타날 수 있다는 문제점이 제기되었다. 이러한 문제점을 보완하기 위하여, 췌장의 베타세포와 동일한 포도당 감식체계를 가지고 있는 간세포를 대상으로 하여, 재조합 레트로바이러스(recombinant retrovirus)와 프로인슐린의 cDNA를 이용한 유전자치료가 시도되었는데, 간세포에는 프로인슐린을 인슐린으로 전환시키는 효소가 없기 때문에, 생물학적 활성이 저하된 프로인슐린만이 주로 발현되어 실제로 당뇨쥐에서 뚜렷한 효과를 얻지는 못한 것으로 알려져 있다. 또한, 재조합 레트로바이러스는 세포분열중에 있는 세포에만 안정적으로 치료유전자를 삽입시킬 수 있는 특성을 가지고 있는데, 성인 간의 경우 대부분의 간세포는 정지기 상태에 있고, 약 0.1 내지 0.5%만이 세포분열을 수행하므로, 이러한 안정기의 기관에 재조합 레트로바이러스를 감염시키는 것은 치료유전자의 이입효율을 떨어뜨리게 된다.

<30> 이러한 문제점을 해결하기 위해서, 당뇨쥐에서 부분 간 절제술로 70%의 간을 제거하여 간세포분열을 유도함으로써, 생체내 조건에서 효과적인 치료유전자의 이입을 시도하기도 하였으나, 실제 임상적으로 적용하기에는 번거로울 뿐만 아니라 너무 위험하여 적합하지 못한 방법이라는 반론이 제기되었기 때문에, 장기간 안정적인 치료유전자의 발현이 가능하고, 정지기 상태에 있는 대상세포에도 이입효율이 뛰어난 아데노연합바이러스(AAV, Adeno-associated virus) 벡터 시스템을 이용하여 근육세포에 인슐린유전자치료를 시도되기도 하였는데, 치료유전자의 발현이 혈당농도의 변화에 따라 조절되어지지 못하여, 고인슐린혈증으로 인한 저혈당이 우려된다는 문제점을 해결하지 못하고 있는 실정이다.

<31> 따라서, 인슐린 유도체의 유전자의 발현이 혈당농도에 의하여 조절되는 유전자 치료백터를 개발하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<32> 이에, 본 발명자들은 인슐린 유도체의 유전자의 발현이 혈당농도에 의하여 조절되는 유전자 치료백터를 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 높은 혈당강하 효과를 나타내는 단일사슬 인슐린 유도체(single-chain insulin analog, SIA)를 개발하였고, 전기 유도체를 코딩하는 유전자 및 혈중 포도당 농도에 따라 전기 유전자를 발현시키는 유전자 치료용 백터를 제조하고, 전기 백터를 바이러스에 클로닝하여 제조된 재조합 바이러스를 당뇨병의 증세를 나타내는 동물의 간에 주입할 경우, 이 백터가 지속적으로 SIA를 발현시켜서, 당뇨병을 치료할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

<33> 결국, 본 발명의 첫 번째 목적은 단일사슬 인슐린 유도체를 제공하는 것이다.

<34> 본 발명의 두 번째 목적은 전기 유도체를 유효성분으로 함유하는 인슐린 결핍성 당뇨병 치료제를 제공하는 것이다.

<35> 본 발명의 세 번째 목적은 전기 유도체를 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.

<36> 본 발명의 네 번째 목적은 혈중 포도당 농도에 따라 전기 유전자를 발현시키는 발현백터를 제공하는 것이다.

<37> 본 발명의 다섯 번째 목적은 전기 유전자를 포함하는 재조합 바이러스 백터를 인간

을 제외한 포유동물에 투여하여, 당뇨병을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<38> 본 발명의 단일사슬 인슐린 유도체(SIA)는 인슐린 또는 인슐린 유도체의 B 사슬; 인슐린 또는 인슐린 유도체의 A 사슬; 및, 전기 B 사슬과 A 사슬의 사이에 위치하고, 5 내지 18개의 아미노산 서열을 가지며, 하기 일반식(I)의 구성을 갖는 펩티드를 포함한다.

<39>
$$U_m - Y - U_n \quad (I)$$

<40> 상기 식에서,

<41> U는 arg 또는 lys이고;

<42> Y는 최소한 1개의 gly을 포함하는 3 내지 16개의 아미노산 서열을

<43> 가지는 펩티드이며;

<44> m은 0 또는 2이고; 및,

<45> n은 $2-m$ 이다.

<46> 본 발명자는 전기 SIA 중 하나인 SIA-1을 수득하기 위하여, 65 내지 68bp 크기를 갖는 5개의 프라이머를 사용하여 중복확장 중합효소 연쇄반응(overlapping-extension PCR)을 수행하여 SIA-1의 cDNA를 수득하고, 이를 이용하여 대장균에서 SIA-1을 발현시키

기 위한 발현벡터인 pET-SIA-1을 작제하였다. 전기 발현벡터 pET-SIA-1은 N-말단에 TNF의 N-말단 아미노산 서열인 MPSDK의 아미노산 서열, 니켈 결합부위인 10개의 히스티딘 및 스페이서로서 SSGSM의 아미노산 서열이 첨가된 SIA-1을 코딩하는 cDNA를 포함한다. 전기 발현벡터를 사용하여 대장균에서 SIA-1을 발현시키고 분리하여, 분리된 SIA-1의 수용체 결합능력과 포도당 흡수정도를 분석하여 SIA-1의 생물학적 활성도를 측정하였다. 그 결과, 인슐린과는 달리 별도의 프로세싱과정 없이도 SIA-1은 인슐린과 유사한 생물학적 활성을 나타내며, 활성의 정도가 프로인슐린보다 2 내지 3배나 높고 인슐린보다 2배 낮음을 알 수 있었다. 이로부터, SIA-1이 당뇨병 치료제로서 사용될 수 있음을 알게 되었을 뿐만 아니라, SIA-1을 포함하는 SIA가 당뇨병 치료제로서 사용될 수 있음을 알게 되었다. 아울러, SIA를 코딩하는 유전자를 이용한 당뇨병의 유전자 치료 역시 가능함을 알 수 있었다.

<47> 이에 따라, 당뇨병의 유전자 치료(gene therapy)를 목적으로 동물의 세포에서 SIA-1을 발현시킬 수 있는 벡터인 pSIA-1 및 pLPK-SIA-1을 작제하였다. 전기 발현벡터 pLPK-SIA-1은 혈중 포도당의 농도에 따라 SIA-1의 발현이 조절될 수 있도록, L형 피루브산 인산화효소(L-type pyruvate kinase, LPK)의 프로모터를 포함하고, N-말단 부위에 알부민 리더 시퀀스의 24개 아미노산을 포함하며, SV40 poly(A) 신호서열과 SV40 인핸서(enhancer)를 포함하고 있고, pSIA-1은 LPK 프로모터를 제외하고는 pLPK-SIA-1과 동일한 구성요소를 포함한다. 이들 벡터를 당뇨병 증상을 나타내는 쥐에 주입하였을 때, pSIA-1은 생체내에서 SIA의 혈당 저하기능을 나타내지 못한 반면, pLPK-SIA-1은 생체내에서 SIA의 혈당 저하기능을 나타내었으므로, LPK 프로모터가 SIA를 생체내에서 발현시키는 데 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 이에, 본 발명자들은 발현벡터

pPLK-SIA-1을 대장균(E. coli) JM109에 도입하여 형질전환된 대장균을 제조하고, 'pLPK-ST2 in JM109'라 명명하였으며, 이를 2000년 5월 17일자로 대한민국 서울시 서대문구 홍제 1동 361-221번지에 소재하는 국제기탁기관인 한국종균협회 부설 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 기탁번호 KCCM-10188로 기탁하였다.

<48> 전기 pLPK-SIA-1을 세포내에서 장시간 동안 발현시킬 수 있도록, SIA-1의 염기서열, SV40 poly(A) 신호서열, SV40 인핸서(enhancer) 및 LPK 프로모터를 포함하는 재조합 바이러스 벡터인 rAAV-LPK-SIA-1을 작제하였다. 전기 재조합 바이러스 벡터를 당뇨병의 일종인 비비만성 당뇨병증상을 나타내는 쥐(non-obese diabetic mouse, NOD mouse)에 투여하였을 경우, SIA-1에 의한 혈당의 조절 효과가 약 8개월 동안 지속됨을 알 수 있었고, 재조합 바이러스 벡터에 의한 간세포의 손상도 나타나지 않음을 알 수 있었다.

<49> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

<50> 실시예 1: SIA의 클로닝 및 대장균에서의 발현

<51> 실시예 1-1: SIA-1의 클로닝 및 대장균에서의 발현

<52> 65 내지 68bp의 크기를 갖는 다섯 개의 중복 프라이머를 사용한 PCR을 수행하여, 프로인슐린의 C-펩티드 부분이 GGGPGKR(서열번호 2)로 치환된 SIA-1을 코딩하는 염기서열을 획득하였다(서열번호 1). PSDKP서열과 10개의 히스티딘 잔기를 코딩하는 염기서열을 합성하고, 이를 제한효소인 NdeI과 BamHI으로 절단한 후, 발현벡터인 pET-3a의 T7 프로모터의 아랫쪽에 삽입하고, 이를 다시 동일한 제한효소로 절단하여 직선형의 플라스미드 pET를 획득하였다. 이어, 전기 SIA-1을 코딩하는 염기서열과 플라스미드 pET를 각각 BamHI과 HindIII로 절단하고, 절단된 산물을 연결하여 발현벡터 pET-SIA-1을 작제하였다. 전기 작제된 발현벡터 pET-SIA-1을 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 형질전환시켰다.

<53> 실시예 1-2: SIA-2의 클로닝 및 대장균에서의 발현

<54> C-펩티드 부분이 RRGPGGG(서열번호 3)로 치환된 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 발현벡터 pET-SIA-2를 획득하고, 이를 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 형질전환시켰다.

<55> 실시예 1-3: SIA-3의 클로닝 및 대장균에서의 발현

<56> C-펩티드 부분이 GGGGGKR(서열번호 4)로 치환된 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동

일한 방법으로 발현벡터 pET-SIA-3을 수득하고, 이를 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 형질 전환시켰다.

<57> 실시예 1-4: SIA-4의 클로닝 및 대장균에서의 발현

<58> C-펩티드 부분이 RRGGGGG(서열번호 5)로 치환된 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 발현벡터 pET-SIA-4를 수득하고, 이를 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 형질 전환시켰다.

<59> 실시예 1-5: SIA-5의 클로닝 및 대장균에서의 발현

<60> C-펩티드 부분이 GGAPGDVKR(서열번호 6)로 치환된 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 발현벡터 pET-SIA-5를 수득하고, 이를 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 형질 전환시켰다.

<61> 실시예 1-6: SIA-6의 클로닝 및 대장균에서의 발현

<62> C-펩티드 부분이 RRAPGDVGG(서열번호 7)로 치환된 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 발현벡터 pET-SIA-6을 수득하고, 이를 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 형질 전환시켰다.

<63> 실시예 1-7: SIA-7의 클로닝 및 대장균에서의 발현

<64> C-펩티드 부분이 GGYPGDVKR(서열번호 8)로 치환된 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 발현벡터 pET-SIA-7을 수득하고, 이를 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 형질전환시켰다.

<65> 실시예 1-8: SIA-8의 클로닝 및 대장균에서의 발현

<66> C-펩티드 부분이 RRYPGDVGG(서열번호 9)로 치환된 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 발현벡터 pET-SIA-8을 수득하고, 이를 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 형질전환시켰다.

<67> 실시예 1-9: SIA-9의 클로닝 및 대장균에서의 발현

<68> C-펩티드 부분이 GGHPGDVKR(서열번호 10)로 치환된 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 발현벡터 pET-SIA-9를 수득하고, 이를 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 형질전환시켰다.

<69> 실시예 1-10: SIA-10의 클로닝 및 대장균에서의 발현

<70> C-펩티드 부분이 RRHPGDVGG(서열번호 11)로 치환된 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 발현벡터 pET-SIA-10을 수득하고, 이를 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 형질전환시켰다.

<71> 실시예 1-11: SIA-11의 클로닝 및 대장균에서의 발현

<72> C-펩티드 부분이 GPGKR(서열번호 12)로 치환된 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 발현벡터 pET-SIA-11을 수득하고, 이를 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 형질전환시켰다.

<73> 실시예 1-12: SIA-12의 클로닝 및 대장균에서의 발현

<74> C-펩티드 부분이 GGGGGGGYPGDVGGGK(서열번호 13)로 치환된 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법으로 발현벡터 pET-SIA-12을 수득하고, 이를 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 형질전환시켰다.

<75> 실시예 1-13: SIA의 정제

<76> 실시예 1-1 내지 1-12에서 수득한 발현벡터 pET-SIA-1 내지 pET-SIA-12으로 대장균

BL21(DE3)을 형질전환시킨 결과, SIA 단백질은 과발현되어 불용체(inclusion body)를 형성하였다. 상기 각 불용체의 시스테인 부위를 설펜화(sulfonation)시키고 CNBr를 처리하여 화학적으로 절단하였다. S-설펜화된 SIA(0.37mg/ml)를 양이온교환 크로마토그래피로 정제하고, 100mM β -머캅토에탄올이 포함된 50mM 글리신 완충용액(pH 11)에서 20시간동안 리폴딩(refolding)하였다. 그런 다음, H_3PO_4 을 첨가하여 반응을 종결시키고, HPLC(Zorbax C8 column, 90%(v/v) 아세토니트릴)를 이용하여 SIA 단백질을 순수분리하였다.

<77> 실시예 2: SIA의 활성도 측정

<78> 전기 실시예 1에서 수득한 각종 SIA의 활성도를 측정하기 위하여, 8주된 몸무게 200 내지 250g의 웅성 Sprague-Dawley(SD) 쥐에, 인산염완충용액(8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na_2HPO_4 및 0.24g KH_2PO_4)에 4 내지 80 μ g/0.1ml의 농도로 용해시킨 SIA-1을 쥐의 체중 100g당 0.1ml의 비율로 피하에 주사하고, 30분, 1, 2, 3 및 4시간 후, 꼬리에서 혈액을 채취하여 혈당량의 저하능력을 ED_{50} 의 수치로 비교하였다(참조: 표 1). 이때, ED_{50} 의 수치는 SIA-1을 주사하고 1 또는 2시간 후, 최고 혈당 저하능의 50%를 나타낼 수 있는 SIA의 투여량을 나타낸다.

<79>

【표 1】

SIA의 혈당저하능(nmol/kg)

	1시간	2시간
인간의 인슐린	1.5±0.34	1.8±0.37
인간의 프로인슐린	9.1±1.12	9.6±1.28
SIA	3.6±0.42	3.4±0.18

<80> 상기 표 1에서 보듯이, SIA-1에 의한 혈당량의 저하정도는 프로인슐린에 비하여 2 내지 3배나 높고 인슐린보다 2배 낮음을 알 수 있었다. 결국, SIA가 생체내에서 프로인슐린 및 인슐린과 비슷한 효과를 나타냄을 알 수 있으므로, SIA를 코딩하는 유전자를 이용한 유전자 치료가 가능함을 알 수 있었다.

<81> 투여방법 및 효과량

<82> 본 발명의 SIA-1을 유효성분으로 함유하고 약제학적으로 허용가능한 담체를 첨가한 약제학적 조성물은 주사제, 액제 등의 약학적 제제로 제조되어 복강내, 피하, 근육 또는 정맥주사 등의 주사제로 제조될 수 있다. 사용시 용해하여 사용가능한 동결건조주사제로 제제화가 가능하다. 안정제, 용해보조제, 현탁화제, 유화제, 완충제, 보존제 또는 무통화제를 사용할 수 있다. 항산화제의 경우 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤을 사용할 수 있으며, 킬레이트제로 EDTA를 사용할 수 있고, 보존제의 경우 0.002%의 질산페닐수은, 0.01%의 티메로살, 0.01% 염화벤잘코늄, 0.5%의 페놀, 0.3 내지 0.5%의 크레졸, 0.18%의 파라옥시안식향산메틸, 0.02%의 파라옥

시안식향산프로필 또는 2%의 벤질알코올을 사용할 수 있다. pH 및 삼투압이 현저히 차이가 날 경우, 벤질알코올, 염산프로카인, 염산리도카인, 클로로부탄올 등의 국소마취제 또는 포도당, 이노시톨 등의 무통화제를 사용할 수 있으며, 삼투압 조절을 위하여 포도당 또는 염화나트륨을 포함하는 등장액을 첨가할 수 있다. 본 발명의 SIA-1을 유효성분으로 하는 주사제의 제조에 있어서, 주사액은 발열성 물질시험법, 무균시험, 이물시험, 주사제의 용제의 불용성 이물검사법을 수행하여 안전성을 측정할 수 있으며, 앰플로 제조되는 주사제의 경우 용봉검사를 수행하는 것이 바람직하다. 통상적으로, 주사제 용기는 170℃에서 2시간 동안 행해지는 건열법 또는 121℃에서 20분 동안 행해지는 증기법 멸균 등의 멸균조작을 수행하는 것이 바람직하다.

<83> SIA-1의 투여량은 환자의 연령, 체중 및 질환의 정도에 따라 차이가 있으나, 당뇨병 치료제로 사용되는 경우, 통상 성인(체중 60kg 기준)의 경우 비경구로 1일 1회 40mg 내지 56mg으로 투여하는 것이 바람직하며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자의 경험에 의하여 적절히 결정될 수도 있다.

<84> 급성독성 시험

<85> 본 발명에서 당뇨병 치료제로서 사용되는 SIA의 급성독성을 알아보기 위하여, SIA-1을 용성 SD 쥐에 피하주사하고, 투여후 7일간에 걸쳐 마우스의 사망수를 관찰하여 LD₅₀ 값을 결정하였는 바, LD₅₀ 값은 약 8mg/kg이었다. 따라서, 상기 표시하는 유효량의 범위에서, 본 발명의 SIA-1을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료제는 충분히 안전한

약물임을 알 수 있었다.

<86> 실시예 3: pLPK-SIA-1의 작제

<87> 전기 SIA를 코딩하는 유전자를 이용한 당뇨병의 유전자 치료방법을 개발하기 위하여, 동물세포에서 SIA가 분비될 수 있도록 SIA의 발현백터를 새로이 작제하였다.

pET-SIA-1의 SIA-1 cDNA를 PCR-script SK⁺(Invitrogene, San Diego, U.S.A.)의 BamHI/HindIII 부위에 삽입하고, pCDM8(Invitrogene)을 주형으로 이용한 PCR을 수행하여 수득한 SV40 poly(A) 신호서열을 HindIII/ApaI 부위에 삽입하며, pGL3-enhancer(Promega, Madison, U.S.A.)를 주형으로 이용한 PCR을 수행하여 수득한 SV40 인핸서를 ApaI 부위에 삽입하였다. 또한, LPK 프로모터는 프라이머 1:

5'-attctagagaattccaggcatcagc-3'(서열번호 14)과 프라이머 2: 5'-atgtcgacgctgtacgttgcttacc-3'(서열번호 15)을 사용하여 PCR을 수행하여 수득하였다. 아울러, 프라이머 3: 5'-ttagctcggttattccaggggtgtgttcgtcgagatttcgttaatcagcacctgtgcgc t-3'(서열번호 16), 프라이머 4: 5'-agagaaaaagaaggaaataaagggttaccacttcatggatcgcgccagtcgtcgacgtgct-3'(서열번호 17) 및 키트(ExsiteTM PCR based site directed mutagenesis kit)를 사용하여, 72bp의 알부민 리더 시퀀스를 전기 삽입된 SIA-1의 cDNA의 5'에 연결하여, pLPK-SIA-1을 작제하였다(참조: 도 1). 또한, 동일한 방법으로 LPK 프로모터가 연결되지 않은 pSIA-1을 작제하였다.

<88> 전기 작제된 발현백터 pLPK-SIA-1를 대장균(E. coli) JM109에 도입하여 형질전환된

대장균을 제조하고, 'pLPK-ST2 in JM109'라 명명하였으며, 이를 2000년 5월 17일자로 대한민국 서울시 서대문구 홍제 1동 361-221번지에 소재하는 국제기탁기관인 한국종균협회 부설 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 기탁번호 KCCM-10188로 기탁하였다.

<89> 실시예 4: pLPK-SIA-1에 의한 유전자 치료

<90> pLPK-SIA-1에 의한 당뇨병의 유전자 치료여부를 조사하기 위하여, 30 μ g의 pSIA-1과 감염보조제인 FuGENETM6(Boehringer Mannheim GmbH, Laval PQ)의 혼합물 및 30 μ g의 pLPK-SIA-1과 FuGENETM6의 혼합물을 스트렙토조토신(streptozotocin, STZ)으로 당뇨병이 유도된 SD쥐의 간문맥에 각각 주입하고 2주동안 혈당량을 측정하였다(참조: 도 2). 도 2는 동물세포에서 LPK 프로모터가 SIA-1의 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프로써, (■)는 pSIA-1의 경우를 나타내고, (●)는 pLPK-SIA-1의 경우를 나타낸다. 도 2에서 보듯이, LPK 프로모터를 가지지 않은 SIA-1를 주입한 쥐에서는 높은 혈당량이 유지되었으나 pLPK-SIA-1를 주입한 쥐에서는 주입 후 2일째부터 혈당량이 저하되기 시작하여 5일째에는 정상 혈당량상태(normoglycemic state)로 회복되었고, 이것은 4일간 유지되었다.

<91> 한편, pLPK-SIA-1 및 pSIA-1의 주사 5일 후, 간, 신장, 비장, 폐 및 심장에서 LPK-SIA-1 및 SIA-1의 DNA와 mRNA의 수준을 측정하였다. 먼저, SIA-1의 DNA 수준을 측정하기 위하여, 전기 조직에서 추출한 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 5: 5'-gtaatacgactcactatagggc-3'(서열번호 18)과 프라이머 6: 5'-gcgcaaggttttactag

ttacaatagtt-3'(서열번호 19)를 사용하여 PCR을 수행하고, LPK-SIA-1의 DNA 수준을 측정하기 위하여, 전기 조직에서 추출한 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 7:

5'-atttcgaataagaagaggaagggaag-3'(서열번호 20)과 프라이머 6: 5'-gcgcaaggttttactagttacaatagtt-3'(서열번호 19)를 사용하여 PCR을 수행하였다(참조: 도 3). 도 3은

SIA-1과 LPK-SIA-1의 DNA를 간(Li), 신장(K), 비장(S), 폐(Lu) 및 심장(H)에서 검출한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다. 도 3에서 보듯이, SIA-1과 LPK-SIA-1의 DNA는 간에만 존재하고 있음을 알 수 있었다. 그런 다음, 이들의 발현여부를 알아보기 위하여, 간에서 SIA-1의 mRNA 수준을 측정하였다. 즉, 간에서 추출한 모든 RNA를 주형으로 하고, 프라이머 8: 5'-gcgcgatccatgttcgttaatcagcac-3'(서열번호 21)과 프라이머 9:

5'-gcgcaagcttttactagttacaatagtt-3'(서열번호 22)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였으며, 대조군으로서 β -액틴의 mRNA를 사용하였다(참조: 도 4). 도 4는 SIA-1과 LPK-SIA-1의 mRNA를 간에서 간접적으로 검출한 결과를 나타내는 전기영동 사진이다. 도 4에서 보듯이, LPK-SIA-1의 유전자만이 정상적으로 발현되고 있음을 알 수 있었다.

<92> 실시예 4의 결과에서 보듯이, pLPK-SIA-1를 사용한 당뇨병의 치료는 일시적임을 알 수 있었으므로, 이러한 단점을 보완하기 위하여, 장기적인 유전자치료에 유리한 벡터인 아데노연합바이러스 벡터에 본 발명의 LPK-SIA-1유전자를 재조합시켰다. pLPK-SIA-1의 LPK 프로모터, SIA-1유전자, SV40의 인핸서 및 poly(A) 서열을 포함하는 부위를 PCR로 증폭하고 아데노연합바이러스 벡터(psub201)의 XbaI 부위에 삽입하여, 발현벡터 psub201-LPK-SIA-1를 작제하며, 리포펙타민(Lipofectamine, Gibco-BRL)의 처리 조건하에서, 전기 발현벡터와 플라스미드 pXX2를 인간의 배아 신장 293세포주(ATCC CRL 1573, Manassas, VA)에 전이시켰다. 전이 6시간 후, 아데노바이러스 타입 5 dl312 바이러스를

감염시키고, 3일이 경과한 다음, HEPES 완충용액(140mM NaCl, 0.7mM Na₂HPO₄, 25mM HEPES, pH 7.0)을 이용하여 세포를 수확하고, 3번의 동결-해동으로 세포를 용혈시키며, 이를 2,000 x g로 20분간 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 두 번의 세슘농도구배방법(CsCl equilibrium density gradients)을 사용하여, 전기 수득한 상등액으로부터 재조합 바이러스(rAAV-LPK-SIA-1)를 순수정제하고, 재조합 바이러스를 불활성화하기 위하여 56℃에서 45분간 가열하였다. 순수분리된 재조합 바이러스의 수를 정량하고, 1 x 10¹² particles/ml의 농도로 -70℃에 보관하였다.

<93> 실시예 6: 재조합 바이러스에 의한 당뇨병의 유전자치료

<94> 전기 재조합 바이러스를 STZ-처리로 당뇨병이 유도된 쥐의 간문맥으로 주입하여, LPK-SIA-1에 의한 당뇨병의 유전자치료 효과를 알아보았다. 먼저, 바이러스의 주입양에 따른 치료효과를 알아보기 위하여, 재조합 바이러스 10¹¹particles을 STZ-처리로 당뇨병이 유도된 쥐에 투입한 결과, 처리 후 일주일만에 정상적 혈당량을 회복함을 알 수 있었고, 정상 혈당량 조절은 8개월간 지속되었다. 이어, 유전자치료를 필요한 적절한 바이러스 주입량을 결정하기 위하여, 10⁹, 10¹⁰, 10¹¹ 및 10¹² 바이러스 particles을 각 쥐에 주입하고, 시간의 경과에 따른 혈당의 변화량을 측정하였다(참조: 도 5). 도 5는 바이러스의 농도와 시간에 따른 혈당량의 변화량을 나타낸 그래프로서, (■)는 10⁹인 경우를 나타내고, (□)는 10¹⁰인 경우를 나타내며, (●)는 10¹¹인 경우를 나타내고, (○)는 10¹²인 경우를 나타낸다. 그 결과, 10¹¹과 10¹² 처리농도에서 가장 정상적인 혈당량이

유지되는 것을 알 수 있었다.

<95> 또한, 이러한 효과가 STZ-처리한 쥐의 췌장에서의 인슐린 재분비에 의한 것이 아님을 확인하기 위하여, 재조합 바이러스를 주입한 쥐의 췌장을 추출하고, 항 인슐린 항체를 사용하여 면역조직학적 검사를 수행한 결과, 본 쥐의 췌장에서는 인슐린이 전혀 발현하지 않았으므로, 혈당량의 조절이 간세포에서 주입된 LPK-SIA-1 유전자의 발현에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

<96> 실시예 7: 재조합 바이러스의 생체내 발현

<97> 간문맥에 주입된 재조합 바이러스 DNA의 상태를 알아보기 위하여, 재조합 바이러스를 주입하고 5일, 5주, 15주, 25주 경과한 후 각각 쥐의 간에서 DNA를 추출하여 서던 블롯(Southern blotting)을 수행하였다(참조: 6). 도 6은 시간의 경과에 따른 LPK-SIA-1의 단일사슬 유전자의 변화를 나타내는 사진으로서, psub201-LPK-SIA-1는 정상 SD쥐의 간에서 LPK-SIA-1의 레벨을 나타내고, NC는 정상 SD쥐의 간의 염색체 DNA를 나타내며, 이들은 대조군으로서 사용되었다. 도 6에서 보듯이, 재조합 바이러스를 처리하고 5일 경과한 SD쥐의 간에서는 외가닥의 LPK-SIA-1의 유전자가 존재하고 있으나, 5일 경과한 SD쥐의 간에서는 외가닥의 LPK-SIA-1의 유전자가 존재하지 않음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 외가닥의 바이러스 DNA가 이중가닥으로 모두 변환하였다는 것을 의미하는 것으로, 재조합 바이러스가 보유한 유전정보가 간세포의 염색체에 삽입되었음을 나타낸다.

<98> 주입된 재조합 바이러스의 생체내 발현을 알아보기 위해 항 SIA-1 항체를 사용하여

간세포에서 바이러스 발현을 면역조직화학적으로 조사하였다(참조: 도 7a, 도 7b). 도 7a는 재조합 바이러스를 처리하고, 1개월이 경과한 간의 조직에서 SIA-1의 면역조직화학적 염색결과를 나타내는 사진이고, 도 7b는 대조군으로서 정상간의 조직에서 SIA-1의 면역조직화학적 염색결과를 나타내는 사진이다. 도 7a 및 도 7b에서 보듯이, 재조합 바이러스를 주입한 간에서만 SIA-1 단백질이 발현됨을 알 수 있었다.

<99> 또한, 재조합 바이러스에 의한 간세포의 손상을 알아보기 위하여, 조직학적 검사를 수행하였다(참조: 도 8a, 도 8b). 도 8a는 재조합 바이러스를 처리하고, 1개월이 경과한 간의 조직사진이고, 도 7b는 대조군으로서 정상간의 조직사진이다. 도 8a 및 도 8b에서 보듯이, 재조합 바이러스에 의하여 간 조직의 이상이 발생하지 않음을 알 수 있었다.

<100> 실시예 8: 재조합 바이러스에 의한 포도당 내구성 실험

<101> 도 9a는 시간의 경과에 따른 대조군과 실험군의 혈당량의 변화를 나타내는 그래프로서, 재조합바이러스를 주입한 쥐에서 발현되는 SIA-1 단백질에 의한 혈당량 조절기능을 좀더 자세히 조사하기 위하여, 포도당 내구성 실험(glucose tolerance test: GTT)를 수행하였다. 정상 SD쥐(대조군)와 재조합 바이러스를 주입하여 당뇨병이 회복된 STZ-처리된 쥐(실험군)을 4시간동안 금식시킨 후, 대조군과 실험군에 2g/kg(체중)의 포도당을 주입하고, 혈액내 혈당량, 인슐린 및 글루카곤의 수치를 측정하고 비교하였다(참조: 도 9a, 도 9b, 도 9c). 도 9a는 시간의 경과에 따른 대조군과 실험군의 혈당량의 변화를

나타내는 그래프로서, (●)는 실험군을 나타내고 (■)는 대조군을 나타낸다. 도 9a에서 보듯이, 대조군에서는 포도당을 주입하고 30분이 경과한 후, 혈당 수치가 가장 높고, 90분이 경과한 후에는 정상수치를(약 100mg/ml) 회복한 반면, 실험군에서도 비슷한 결과를 보여주었으나, 다만 정상수치로 회복하는 기간이 대조군보다 길었다(120분). 도 9b는 시간의 경과에 따른 대조군의 혈중 인슐린양과 실험군의 혈중 SIA의 양의 변화를 나타내는 그래프로서, (●)는 실험군을 나타내고 (■)는 대조군을 나타낸다. 도 9b에서 보듯이, 대조군에서의 인슐린 양은 포도당을 주입하고 30분이 경과한 후에 최고치에 달하였고, 1시간이 경과한 후에 기본수치로 회복되었으나, 실험군에서의 혈액내 SIA 단백질량은 포도당을 주입하고 3 내지 5 시간이 경과한 후에 최고치에 달하였고, 6시간이 경과한 후에 기본수치로 회복되었다. 이러한 결과는 대조군에서는 이미 합성된 인슐린을 혈당치에 따라 즉각 방출하여 혈당치를 조절하지만, 실험군에서는 혈당치에 따라 새로이 인슐린을 합성하므로, 이에따른 시간적인 차이가 보이는 것으로 분석되었다. 또한, SIA-1은 인슐린보다 반감기가 길기 때문에 혈중에 장기간 잔류하는 것으로 판단되었다. 도 9c는 시간의 경과에 따른 대조군과 실험군의 혈중 글루카곤의 농도의 변화를 나타내는 그래프로서, (●)는 실험군을 나타내고 (■)는 대조군을 나타낸다. 도 9c에서 보듯이, 대조군과 실험군 모두 글루카곤의 발현양상은 유사하고, 단지 발현양이 차이가 있음을 알 수 있었다. 이는 SIA-1이 인슐린 보다 반감기가 길기 때문에 나타난 결과로 분석되었다.

<103> 당뇨병의 한 종류인 비비만형 당뇨병 쥐(non-obese diabetic mouse, NOD mouse)에 재조합 바이러스가 미치는 영향을 알아보았다. NOD 쥐에 PBS를 주입한 대조군과 재조합 바이러스 10^{12} particles을 주입한 실험군의 혈당량을 시간의 경과에 따라 측정하였다(참조: 도 10a). 도 10a는 대조군과 실험군의 혈당량을 시간의 경과에 따라 측정한 결과를 나타내는 그래프로서, (●)는 실험군을 나타내고 (■)는 대조군을 나타낸다. 도 10a에서 보듯이, 15일 이후 대조군은 사멸하였으나, 실험군은 7일이 경과한 후, 정상 혈당량을 회복하였으며, 이러한 혈당량은 150일 이상동안 유지되었다. 이를 확인하기 위하여, 실시예 8과 동일한 방법으로 실험군에 대한 GTT를 수행하였다(참조: 도 10b). 도 10b는 시간의 경과에 따른 대조군과 실험군의 혈당량의 변화를 나타내는 그래프로서, (●)는 실험군을 나타내고 (■)는 대조군을 나타낸다. 도 10b에서 보듯이, 실험군에서는 포도당 주입하고 120분이 경과한 후 정상 혈당량(115 mg/ml)으로 회복되었다.

<104> 상술한 결과에서 보듯이, 본 발명의 SIA 유전자와 LPK 프로모터를 조합하여 작성된 재조합 바이러스 벡터를 바이러스에 클론한 재조합 바이러스를 이용하여, 당뇨병의 유전자 치료가 가능함을 알 수 있었다.

【발명의 효과】

<105> 이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 단일사슬 인슐린 유도체(single-chain insulin analog, SIA), 전기 유도체를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료제, 전기 유도체를 코딩하는 유전자, 전기 유전자를 포함하는 유전자 치료용 벡터 및

전기 벡터를 이용한 당뇨병의 유전자 치료방법을 제공한다. 본 발명의 당뇨병의 유전자 치료방법은 SIA의 염기서열, SV40 poly(A) 신호서열, SV40 인핸서(enhancer) 및 L형 피루브산 인산화효소(LPK)의 프로모터를 바이러스 벡터에 삽입하여 재조합 바이러스 벡터를 작제하고, 이를 세포주에 전이시키는 단계; 전기 세포주에 바이러스를 감염시키고, 바이러스가 감염된 세포주를 배양한 다음, 이로부터 바이러스를 수득하는 단계; 및, 수득한 바이러스를 불활성화시키고, 이를 당뇨병 증상을 나타내는 인간이 아닌 포유동물에 주입시키는 단계를 포함한다. 본 발명의 유전자 치료용 벡터는 당뇨병의 치료에 필요한 SIA의 발현이 체내의 포도당 농도에 따라 조절되므로, 당뇨병을 치료하는데 이용될 수 있을 것이다.

<106> 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

- (i) 인슐린 또는 인슐린 유도체의 B 사슬;
- (ii) 인슐린 또는 인슐린 유도체의 A 사슬; 및,
- (iii) 전기 B 사슬과 A 사슬의 사이에 위치하고, 5 내지 18개의 아미노산 서열을 가지며, 하기 일반식(I)의 구성을 갖는 펩티드를 포함하는 단일사슬 인슐린 유도체 (single-chain insulin analog, SIA):

$$U_m - Y - U_n \quad (I)$$

상기 식에서,

U 는 arg 또는 lys이고;

Y는 최소한 1개의 gly을 포함하는 3 내지 16개의 아미노산 서열을

가지는 펩티드이며;

m은 0 또는 2이고; 및,

n은 2-m이다.

【청구항 2】

제 1항의 단일사슬 인슐린 유도체(SIA)를 유효성분으로 포함하고, 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 당뇨병 치료제.

【청구항 3】

제 1항의 일반식(I)의 구성을 갖는 펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 단일사슬 인슐린 유도체-1(SIA-1).

【청구항 4】

제 3항의 단일사슬 인슐린 유도체-1(SIA-1)를 유효성분으로 포함하고, 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 당뇨병 치료제.

【청구항 5】

제 3항의 단일사슬 인슐린 유도체-1(SIA-1)를 코딩하고, 서열번호 1의 염기서열을 가지는 SIA-1의 염기서열.

【청구항 6】

제 5항의 염기서열, SV40 poly(A) 신호서열, SV40 인핸서(enhancer), 알부민 리더 시퀀스 및 LPK 프로모터를 포함하는 단일사슬 인슐린 유도체-1(SIA-1) 발현벡터

pLPK-SIA-1.

【청구항 7】

제 6항의 발현벡터와 감염보조제의 혼합물을 인간을 제외한 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는 당뇨병의 유전자 치료방법.

【청구항 8】

제 7항에 있어서,

혼합물을 인간을 제외한 포유동물의 간문맥에 투여하는 것을

특징으로 하는

당뇨병의 유전자 치료방법.

【청구항 9】

제 7항에 있어서,

당뇨병은 비비만성 당뇨병(non-obese diabetes, NOD)인 것을 특징으로

하는

당뇨병의 유전자 치료방법.

【청구항 10】

제 6항의 발현벡터로 형질전환된 대장균(E. coli) pLPK-ST2 in JM109(pLPK-ST2 in JM109)(KCCM-10188).

【청구항 11】

제 5항의 염기서열, SV40 poly(A) 신호서열, SV40 인핸서(enhancer) 및 LPK 프로모터를 포함하는 재조합 바이러스 벡터 rAAV-LPK-SIA-1.

【청구항 12】

제 11항의 재조합 바이러스 벡터를 인간을 제외한 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는 당뇨병의 유전자 치료방법.

【청구항 13】

제 12항에 있어서,

재조합 바이러스 벡터를 인간을 제외한 포유동물의 간문맥에 투여하는

것을 특징으로 하는

당뇨병의 유전자 치료방법.

【청구항 14】

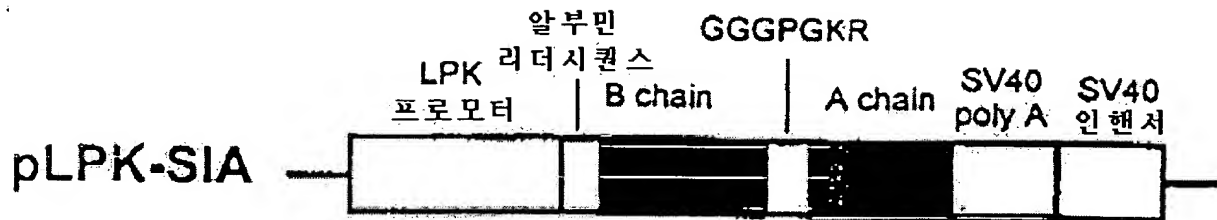
제 12항에 있어서,

당뇨병은 비비만성 당뇨병(non-obese diabetes, NOD)인 것을 특징으로
하는

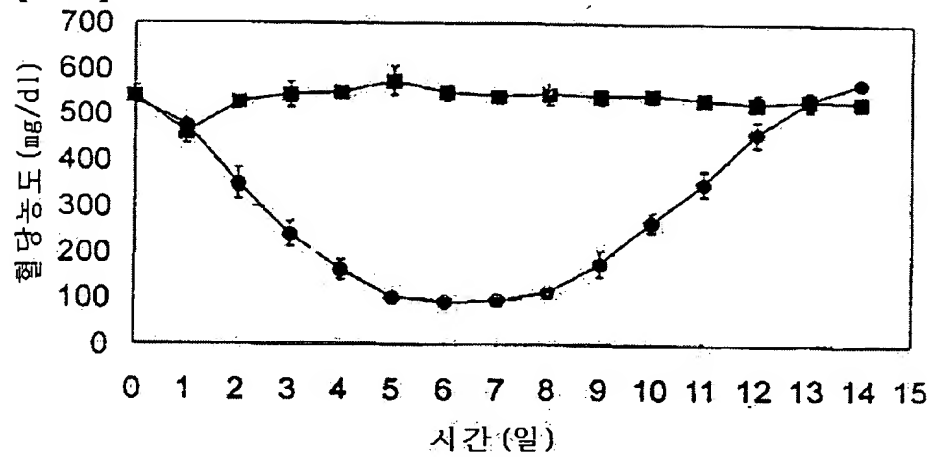
당뇨병의 유전자 치료방법.

【도면】

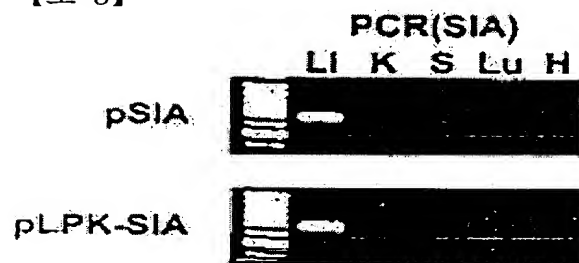
【도 1】



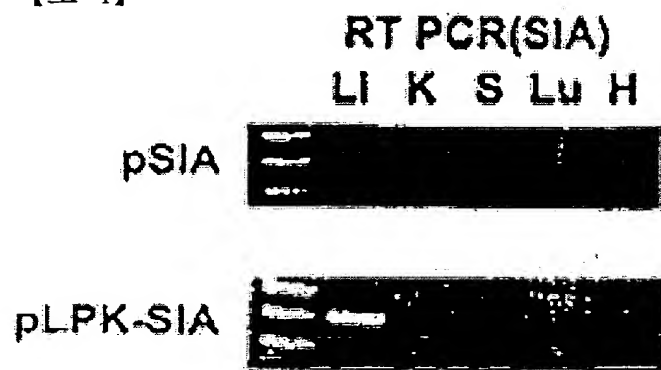
【도 2】



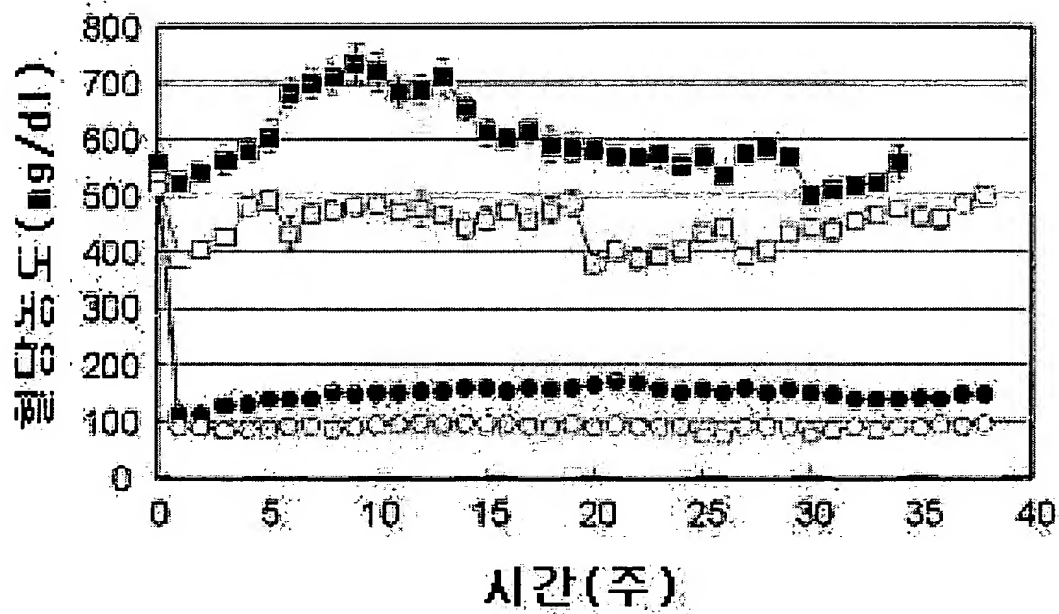
【도 3】



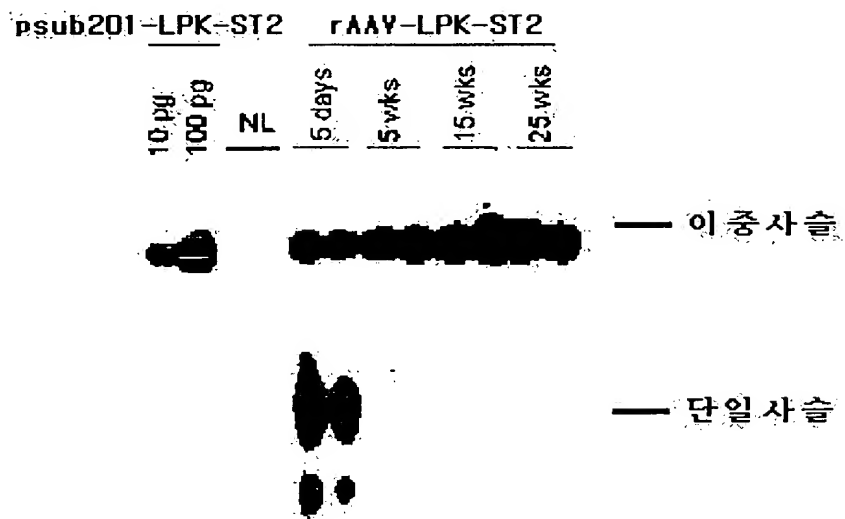
【도 4】



【도 5】



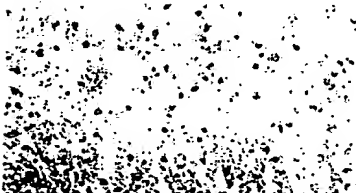
【도 6】



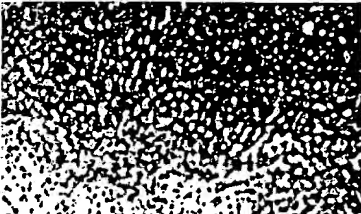
【도 7a】



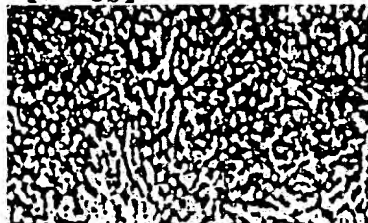
【도 7b】



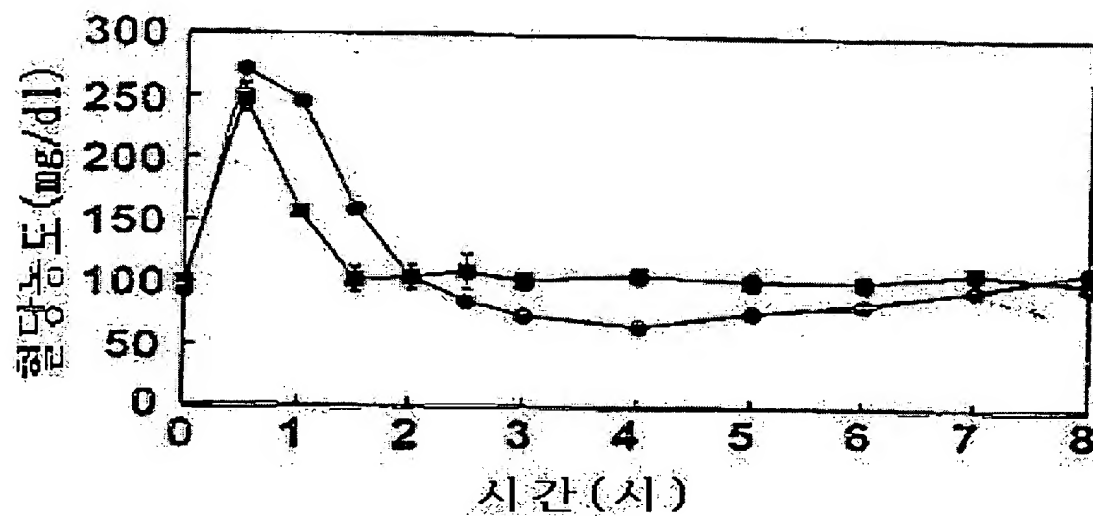
【도 8a】



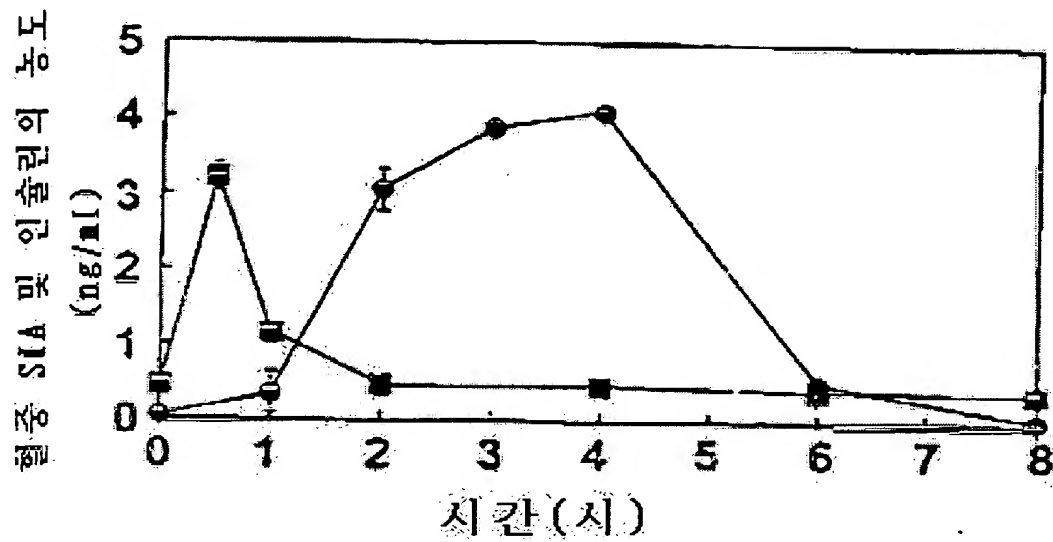
【도 8b】



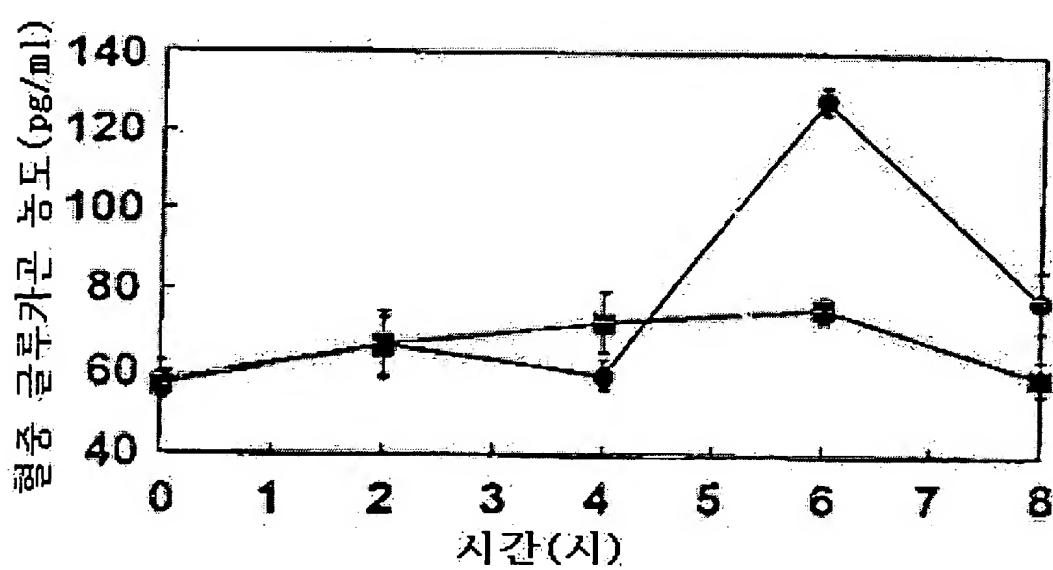
【도 9a】



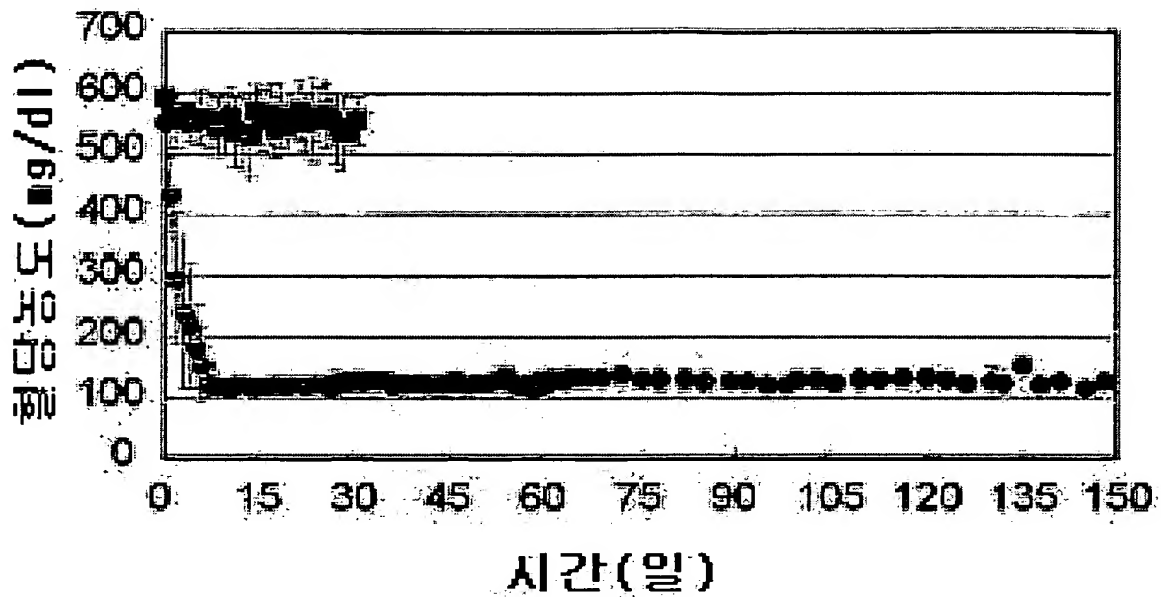
【도 9b】



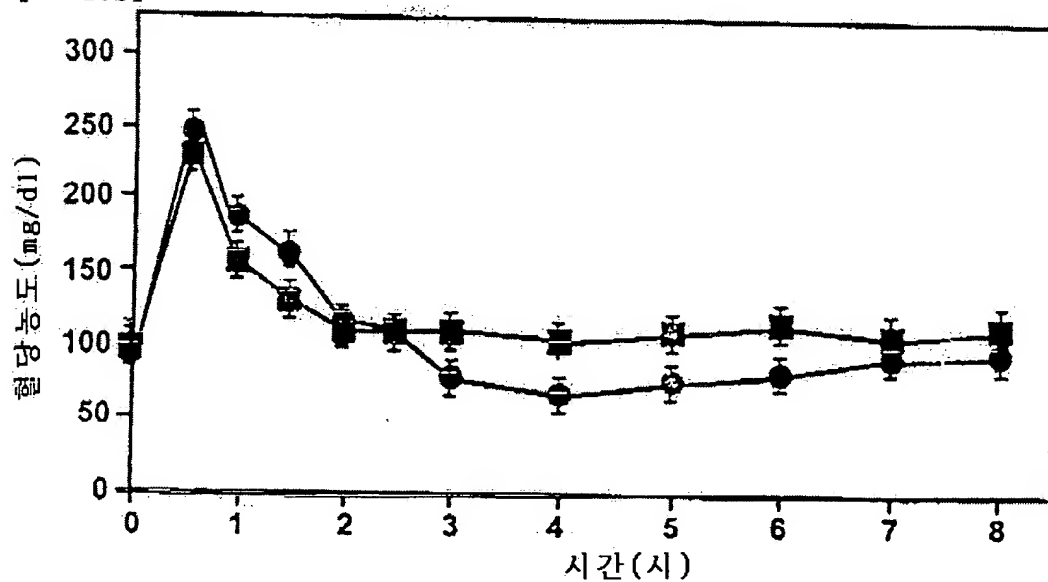
【도 9c】



【도 10a】



【도 10b】



【서열목록】

<110> LEE, Hyun Chul <120> Vector for Curing Diabetes Mellitus
 Containing Gene of Single-chain Insulin Analog <130> DP00508

<160> 22 <170> KOPATIN 1.5 <210> 1 <211> 183
 <212> DNA <213> human single-chain insulin analog <400> 1
 atgttcgtta atcagcacct ctgcggctct cacctggtag aagctctgta cctggtttgc 60 ggtgaacgt
 gttttttcta caccgccaaa accgggtggg gtccgggtaa acgtggcatc 120 gttgaacaat gctgtacta
 catctgctct ctctaccagc tggagaacta ttgtaactag 180 taa
 183 <210> 2 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial
 Sequence <220> <223> synthetic peptides <400> 2 Gly Gly Gly
 Pro Gly Lys Arg 1 5 <210> 3 <211> 7
 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 synthetic peptides <400> 3 Arg Arg Gly Pro Gly Gly Gly 1 5
 <210> 4 <211> 7 <212> PRT <213> Artificial
 Sequence <220> <223> synthetic peptides <400> 4 Gly Gly Gly
 Gly Gly Lys Arg 1 5 <210> 5 <211> 7
 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 synthetic peptides <400> 5 Arg Arg Gly Gly Gly Gly Gly 1 5
 <210> 6 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial
 Sequence <220> <223> synthetic peptides <400> 6 Gly Gly Ala
 Pro Gly Asp Val Lys Arg 1 5 <210> 7
 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220>
 <223> synthetic peptides <400> 7 Arg Arg Ala Pro Gly Asp Val Gly
 Gly 1 5 <210> 8 <211> 9 <212>

PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> synthetic peptides
 <400> 8 Gly Gly Tyr Pro Gly Asp Val Lys Arg 1 5
 <210> 9 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial
 Sequence <220> <223> synthetic peptides <400> 9 Arg Arg Tyr
 Pro Gly Asp Val Gly Gly 1 5 <210> 10
 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220>
 <223> synthetic peptides <400> 10 Gly Gly His Pro Gly Asp Val Lys
 Arg 1 5 <210> 11 <211> 9
 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 synthetic peptides <400> 11 Arg Arg His Pro Gly Asp Val Gly Gly 1
 5 <210> 12 <211> 5 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> synthetic peptides <400> 12
 Gly Pro Gly Lys Arg 1 5 <210> 13 <211> 18
 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>
 synthetic peptides <400> 13 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Pro Gly Asp Val
 Gly Gly Gly Gly 1 5 10 15 Lys
 Arg <210> 14 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> primer 1 <400> 14 attctagaga attccagggc
 atcagc 26 <210> 15 <211>
 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer 2 <400> 15 atgtcgacgc tgctacgttg cttacc

26 <210> 16 <211> 62 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> primer 3 <400> 16 ttagctcggc ttattccagg
 ggtgtgtttc gtcgagattt cgtaatacag cacctgtgcg 60 ct

62 <210> 17 <211> 63 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> primer 4 <400> 17 agagaaaaag aagggaata
 aaggttaccc acttcatgga tccgccagc cgtcgacgct 60 gct

63 <210> 18 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> primer 5 <400> 18 gtaatacgac tcactatagg
 gc 22 <210> 19 <211>

28 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer 6 <400> 19 gcgcaaggtt ttactagtta caatagtt

28 <210> 20 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> primer 7 <400> 20 atttcgaata agaagaggaa
 gggaag 26 <210> 21 <211>

28 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer 8 <400> 21 gcgcgatcc atgttcgtta atcagcac

28 <210> 22 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> primer 9 <400> 22 gcgcaagctt ttactagtta
 caatagtt 28

【서류명】	서지사항보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2000.10.04
【제출인】	
【성명】	이현철
【출원인코드】	420000281087
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이한영
【대리인코드】	919980003751
【포괄위임등록번호】	20000329291
【사건의 표시】	
【출원번호】	1020000058003
【출원일자】	2000.10.02
【심사청구일자】	2000.10.02
【발명의 명칭】	단일사슬 인슐린 유도체의 유전자를 포함하는 당뇨병 치료용 벡터
【제출원인】	
【접수번호】	112000020688536
【접수일자】	2000.10.02
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상 항목】	첨부서류
【보정방법】	정정
【보정내용】	
【첨부서류】	미생물기탁증명서 (사,역문)
【첨부서류】	요약서 .명세서(도면)
【취지】	특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제12조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다.

【수수료】

【보정료】 0

【기타 수수료】 0

【합계】 0

【첨부서류】

미생물기탁증명서 1통 기타 법령에서 정한 증명서류(요약서. 명세서(도면))1통